

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-289295

(43) 公開日 平成7年(1995)11月7日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		A 9453-4B		
C 1 2 N 15/09	Z N A			
// C 1 2 H 1/00		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-92448

(22) 出願日 平成6年(1994)4月28日

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 安井 哲二

神奈川県横浜市鶴見区生麦1-17-1 麒麟

麦酒株式会社横浜工場内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 乳酸菌の検出または同定方法

(57) 【要約】

【目的】 既知の乳酸菌検出用プライマーで検出や同定ができない乳酸菌を検出および同定できるDNA分子、既知の乳酸菌検出用プライマーで検出や同定ができない乳酸菌を迅速に検出または同定する方法、および、ある種の乳酸菌の16S rRNA遺伝子を提供する。

【構成】 配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む、乳酸菌検出用DNA分子；該DNA分子またはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むDNA分子を用いて、試料中の乳酸菌を検出または同定する方法；および配列番号1に示される塩基配列を含む、乳酸菌の16S rRNA遺伝子。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 に示される塩基配列の一部または全部を含む、乳酸菌検出用 DNA 分子。

【請求項 2】 配列番号 1 に示される塩基配列のうち 1 番目から 100 番目までの塩基配列の一部または全部を含む、請求項 1 記載の DNA 分子。

【請求項 3】 配列番号 1 に示される塩基配列のうち少なくとも 40 番目から 57 番目までの塩基配列を含む、請求項 2 記載の DNA 分子。

【請求項 4】 請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の DNA 分子またはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む DNA 分子を用いて、試料中の乳酸菌を検出または同定する方法。

【請求項 5】 請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の DNA 分子またはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む DNA 分子から成るプライマー、および、少なくとも 1 種のユニバーサルプライマーを用いて、試料中に存在する微生物の核酸を増幅する工程を含む、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】 検出すべき乳酸菌がビール混濁能を有するものである、請求項 4 ないし 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 配列番号 1 に示される塩基配列を含む、乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、乳酸菌の検出に使用できる DNA 分子および該 DNA 分子を用いて乳酸菌を検出する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 ビールの保存に際して、ビール中に混入した微生物、特にある種の乳酸菌が増殖してビールを混濁させるなどの有害な作用を呈し、その結果、ビールの品質が低下することが従来より問題となっている。このようなビール有害菌としては、ラクトバチルス プレビス (*Lactobacillus brevis*)、ラクトバチルス カゼイ (*L. casei*) などいくつかの乳酸菌が指摘されており、これらを迅速に検出または同定するための多くの方法が従来より検討されている。

【0003】 例えば、抗原抗体反応を用いた方法（特開平 4-197167 号公報）や、特定のプライマーを用いた PCR 法を利用する方法（ASBC Journal. 51, 63 (1993)）などが開発されている。しかしながら、これらの方法は特定の乳酸菌を検出するための技術であり、他の有害菌の検出漏れが生じる可能性があった。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、既知の乳酸菌検出用プライマーで検出や同定ができない乳酸菌を検出または同定するための DNA 分子を提供することである。本発明の別の目的は、既知の乳酸菌

検出用プライマーで検出できない乳酸菌を迅速に検出または同定する方法を提供することである。本発明のさらなる目的は、ある種の乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、既知のプライマーで検出できないある種の乳酸菌の 16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子の塩基配列を明らかにし、その一部をプライマーとして試料、特にビール中に存在する有害な微生物の核酸に作用させたところ、特定の乳酸菌を検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、配列番号 1 に示される塩基配列の一部または全部を含む、乳酸菌検出用 DNA 分子を提供する。また、本発明は、前記の DNA 分子またはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む DNA 分子を用いて、試料中の乳酸菌を検出または同定する方法を提供する。さらに、本発明は、配列番号 1 に示される塩基配列を含む、乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子を提供する。

【0006】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明の乳酸菌検出用 DNA 分子は、配列番号 1 に示される塩基配列の一部または全部を含むものである。ここで、「DNA 分子」とは、2 個以上のヌクレオチドを含む分子をいうものとする。配列番号 1 は、乳酸桿菌 *Lactobacillus* sp. DA1 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を示している。上記 *Lactobacillus* sp. DA1 は、ビール工場から分離された乳酸桿菌であり、工業技術院生命工学工業技術研究所に平成 6 年 4 月 22 日付けで寄託され、その微生物受託番号は、FERM BP-4652 である。上記塩基配列の中から任意の箇所を選択することができるが、配列の塩基数は少なくとも 10 bp 程度が必要であり、高い検出感度を得るためには、約 15～約 25 bp であることが好ましい。また、菌に対する選択性を上げるためには、配列番号 1 に示される塩基配列のうち、可変領域に相当する 1 番目から 100 番目までの塩基配列、特に 30 番目から 100 番目までの塩基配列の一部または全部を含む DNA 分子が望ましい。具体例としては、配列番号 1 に示される塩基配列のうち 40 番目から 57 番目までの塩基配列（配列番号 2 に示す。）を含む DNA 分子が挙げられる。

【0007】 上記のような塩基配列を含む DNA 分子または該 DNA 分子の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む DNA 分子を用いて、試料中の乳酸菌を検出することができる。上記 DNA 分子あるいは上記 DNA 分子の塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む DNA 分子は、ABI Model 392 and 394 DNA/RNA Synthesizer 操作説明書等に記載の公知の方法に従い化学合成によって作成することができる。

【0008】 試料中の乳酸菌の検出または同定のためには、上記 DNA 分子またはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含む DNA 分子を放射性元素、蛍光色素等

で標識した後、これをプローブとして試料中に存在する微生物の核酸とハイブリダイズさせるハイブリダイゼーション法、これらのDNA分子をプライマーとして用いて、試料中に存在する微生物の核酸を増幅する方法を利用することができるが、検出感度の面からは後者の方法を利用することが好ましい。

【0009】以下に、本発明の検出または同定方法の一例について説明するが、この方法は、上記DNA分子またはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むDNA分子をプライマーとして用いて、試料中に存在する微生物の核酸を増幅する工程を含むものである。まず、試料から、メンブレン濾過等の方法で微生物を分離する。試料としては、製品ビール、熟成前の若ビール、回収酵母等の全ての醸造工程サンプル等を挙げることができる。分離した微生物からそのまま、あるいは、分離した後さらに培養増殖させてから、核酸を抽出する。核酸は、DNA、RNA、DNAとRNAとのハイブリッド、およびこれらの混合物のいずれであってもよいが、DNAであることが好ましい。また、この核酸は、二本鎖および一本鎖のいずれであってもよいが、二本鎖であることが好ましい。PCR法を用いれば微量のサンプルでも検出できるので、例えば菌体数が少なくとも20個であれば十分検出可能である。

【0010】微生物からの核酸の抽出方法としては、従来知られているいかなる方法を用いても良く、例えば、微生物をガラスビーズで粉碎した後、フェノール/クロロホルムで抽出する方法、溶菌酵素処理による抽出方法、オートクレーブにて溶菌後抽出する方法、界面活性剤処理による抽出方法などを用いることができる。本発

表1. 16S rRNAシーケンシングプライマー

名称	配列
27 f	5' AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG 3'
342 r	5' CTGCTGCCTCCCGTAG 3'
357 f	5' CTCCTACGGGAGGCAGCAG 3'
519 r	5' GTATTACCGCGGCTGCTG 3'
530 f	5' GTGCCAGCAGCCGCGG 3'
685 r	5' TCTACGCATTTTCACCGCTAC 3'
907 r	5' CCGTCAATTCTTTGAGTTT 3'
926 f	5' AAACCTCAAAGGAATTGACGG 3'
1100 r	5' GGGTTGCGCTCGTTG 3'
1114 f	5' GCAACGAGCGCAACCC 3'
1392 r	5' ACGGGCGGTGTGTAC 3'
1406 f	5' TGTACACACCGCCCGT 3'
1492 r	5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'
1525 r	5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'

【0012】PCR法に用いるDNAポリメラーゼは95℃の耐熱性を有するものであればその起源は問わない。PCR法の反応条件として、変性温度は90～95℃、アニーリング温度は40～60℃、伸長温度は70～75℃、サイクル数10回以上が好ましいが、これに限定されず、通常PCR法に使用できる条件であればよい。得られた反応生成物は、アガロースゲルを用いた電気泳動法等の検出または同定手段により分離され、増幅産物の有無が確認される。このような方法により、乳酸桿菌 *Lactobacillus*

明の上記のDNA分子またはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むDNA分子から成るプライマー、および、少なくとも1種のユニバーサルプライマーを用いて、抽出された核酸をPCR法により増幅する。プライマーは、二本鎖であっても、一本鎖であってもよいが、PCR法による核酸の増幅効率を上げるためには、一本鎖であることが好ましい。また、プライマーが二本鎖である場合には、PCR法に使用する前にその鎖を分離する処理を行うことが好ましい。ユニバーサルプライマーは全ての細菌に共通な配列を有するプライマーであり、その一例として、Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics John Wiley & Sons Ltd. (1991) P.133 のTABLE 6. 3に記載の16S rRNAシーケンシングプライマーを挙げることができるが、それに限定されることはない。下記の表1に、上記文献のTABLE 6. 3に記載の16S rRNAシーケンシングプライマーの一部を示す。本発明のDNA分子またはその塩基配列に対して相補的な塩基配列を含むDNA分子から成るプライマー、および、ユニバーサルプライマーの組み合わせは、一方がセンスプライマーで他方がアンチセンスプライマーであるような組み合わせであればよく、例えば、配列番号1に示す1～100番目の塩基配列の中からセンスプライマーを設定し、表1に示したユニバーサルプライマーのアンチセンスプライマーと組み合わせることができる。このうち、配列番号2に示す塩基配列を含むDNA分子と907 rとの組み合わせが好ましい。

【0011】

【表1】

sp. DA1、*Lactobacillus* sp. BG2、*Lactobacillus* sp. SE3 と同等な性質、つまり、ビール中で増殖するにもかかわらず、ブレビス等の既知のビール有害乳酸菌プライマーでは検出されない性質の乳酸桿菌を検出または同定することができる。これらの乳酸桿菌は、ビール混濁能を有するものであることがわかっている。従って、本発明の方法により、ビール中に存在する有害な菌を検出または同定することが可能となる。

【0013】さらに、本発明の検出または同定方法を従

来の検出または同定方法と組み合わせることにより、乳酸菌、特に、ビール混濁能を有する乳酸菌をより完全に検出または同定することができる。次に本発明を実施例を用いて具体的に説明するが、本発明の範囲はこれに限定されるものではない。

#### 【0014】

##### 【実施例】

【実施例1】 乳酸桿菌 *Lactobacillus* sp. DA1, sp. BG2 および sp. SE3 の調製

市販のビールあるいはビール工場から分離されたヘテロ型発酵乳酸菌のうち、ビール中で増殖可能で、かつ、抗 *Lactobacillus brevis* JCM1170 血清による抗原抗体反応（特開平4-72570号公報）において反応しない菌株3種を選び、*Lactobacillus* sp. DA1（以下、「DA1菌」と記す）、sp. BG2（以下、「BG2菌」と記す）および sp. SE3（以下、「SE3菌」と記す）とした。

【0015】 【実施例2】 DA1菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列の決定

例1で調製したDA1菌を乳酸菌検出培地M-NBB培地（MBAA Technical Quarterly, 22, 61 (1985)）で4日間、25℃で培養した。菌体培養液1mlを1.5ml容サンプルチューブに入れ、遠心分離をおこなった。沈殿を回収することにより菌体を集菌した後、滅菌蒸留水100μlで2回洗浄した。菌体を滅菌蒸留水100μlに懸濁させ、150μlのフェノール：クロロホルム（1：1）（以下、「P/C」と記す。）と0.4gのガラスビーズ（粒径106μm以下）の入った1.5ml容サンプルチューブに加えて、ミキサーで1分間攪拌した。遠心分離して、水層を別チューブに移し、100μlのP/Cで再抽出し、水層を得て、これをDNA抽出液とした。

【0016】 図1に示した3つのフラグメントA、BおよびCを増幅するために、細菌に共通なユニバーサルプライマー（表1参照）を3対（A. 27f（配列番号3）-907r（配列番号4）、B. 530f（配列番号5）-1392r（配列番号6）、およびC. 1114f（配列番号7）-1525r（配列番号8））用意した。PCR法はGene Amp PCR reagent kit（パーキンエルマー シータス社製）を用いて表2の反応液組成でおこなった。反応は、サーマルサイクラーモデル480（パーキンエルマー シータス社製）中で、変性を94℃、1分間、アニーリングを50℃、1分間、伸長を72℃、1分間順次おこなう工程を25サイクル繰り返すことにより行った。

【0017】

【表2】

表2. PCR反応液組成

蒸留水	70 μl
10Xバッファー	10 μl
dNTP混合物 (各2.5 mM)	8 μl
センスプライマー (20 μM)	5 μl
アンチセンスプライマー (20 μM)	5 μl
DNA抽出液	1 μl
Taq ポリメラーゼ	1 μl

計 100 μl

【0018】 増幅された断片を0.7%アガロースゲルで電気泳動した後切り出し、DNACELL（第1科学薬品社製）を用いてゲルから溶出させた。ゲルから溶出させた断片をP/Cで抽出し、エタノール沈殿により得られたDNAを精製DNAテンプレートとした。次に、ALF DNAシーケンサー（ファルマシア社製）を用い、FITCで蛍光標識したユニバーサルプライマー（表1参照）を適宜使用して、常法に従い、Dyeプライマー法によるジデオキシ法により、得られたDNAの配列決定をおこなった。ジデオキシ法はAuto Cycle Sequencing Kit（ファルマシア社製）を用いておこなった。反応液組成、反応条件は表3に示す。なお、反応はサーマルサイクラー480中でおこなった。

#### 【0019】

【表3】  
オートサイクラーシーケンス反応

反応液組成	反応条件
Master Mix	変性 95℃、30秒 1℃/2秒で降温
精製DNA テンプレート 1 μl (0.3 μg)	アニーリング 45~55℃、30秒 1℃/秒で降温
プライマー 2 μl (2 pmol)	伸長 74℃、84秒 1℃/秒で降温
反応バッファー 2 μl	
dNTP溶液 5 μl	
Diluted Tth DNA 2 μl (2.5単位)	
ポリメラーゼ	25 サイクル
蒸留水 6 μl	
最終体積 18 μl	
A, T, G, CのddNTPが別々に2 μl入ったチューブ4本にMaster Mixを4 μlずつ加える	

【0020】 得られた塩基配列を、配列番号1、並びに、図2~4に示す。比較のために、キリンビール（株）ビール研究所で決定されたラクトバチルス プレビス L63の16S rRNA遺伝子の塩基配列を配列

番号9、並びに、図2~4に示す。図2~4は、DA1菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列（上段に示す）およびラクトバチルス プレビス L63の16S rRNA遺伝子の塩基配列（下段に示す）を比較したものであ

る。図2～4中、線で結んだ部分は、DA1菌とラクトバチルス プレビス L63との間で相同性のある配列部分である。

【0021】図2～4からわかるように、DA1菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列は、全体にわたってラクトバチルス プレビスの16S rRNA遺伝子の塩基配列と異なっている。特に上流100bpまではかなり異なっている。ラクトバチルス属においては5'末端近辺が可変領域であることが知られている(System Appl. Microbiol. 15, 123(1992))。そこで、DA1菌の1～100bpまでの領域について、ジーンバンクに納められている塩基配列とのホモロジーサーチをおこなったところ、90%以上のマッチングを示すDNAは存在しなかった。従来、例えばラクトバチルス プレビスをターゲットにしたプライマーはこの領域の配列を利用したものであり(例えば、前記ASBC Journalに記載のプライマー(配列番号10))、そのプライマーを用いても本菌を検出できないことが予想される。そのほかの既知の乳酸菌検出用プライマーについても同様である。

【0022】〔実施例3〕 配列番号2の塩基配列を有するプライマーの製造

配列番号1に示される塩基配列のうち40番目から57番目までの塩基配列を有するプライマーをABI DNA シンセサイザーモデル392を用いて合成した。得られたプライマーの塩基配列を配列番号2に示す。

【0023】〔実施例4〕 配列番号2の塩基配列を有するプライマーを用いた乳酸菌の検出および同定  
DA1菌、BG2菌およびSE3菌、ラクトバチルス プレビス(JCM1170)、カゼイ(ATCC25303)、ファーマンタム(JCM1560)およびプラントラム(JCM1149)(これらの菌と同じ種に分類される菌の中に、ビール混濁能を有するものが存在することが報告されている)の各菌をM-NBB培地で、2～14日間、25℃で培養した。培養液を例2と同様の方法で処理して、DNA抽出液を得た。これについて、例3で製造したプライマー(配列番号2)およびユニバーサルプライマー907r(配列番号4)を用いてPCR法をおこなった。反応条件は例2と同様であった。得られた反応生成物をアガロースゲルに

配列

```
CGTTGGCGGC GTGCCTAAAT AACATGCAAG TCGAACGAGG TCTCCTAACT GATAGCTGGT 60
GCTTGCATCA GCTTGACGAT AGATCTGACC GAGTGGCGAA CTGGTGAGTA ACACGTGGGT 120
AACCTGCCCC GAAGAAGGGG ATAACACCTG GAAACAGATG CTAATACCGT ATAACAACGA 180
GAACCACATG GTTCTCGTTT GAAAGATGGC TTTTATGCTA TCGCTTCTGG ATGGACCCGC 240
GGCGTATTAG CTAGTTGGTG AGATAATAGC TCACCAAGGC AATGATACGT AGCAGACCTG 300
AGAGGGTAAT CTGCCACAAT GGGACTGAGA CACGGCCCAT ACTCCTACGG GAGGCAGCAG 360
TAGGGAATCT TCCACAATGG ACCAAAGTCT GATGGAGCAA CGCCGCGTCA GTGAAGAAGG 420
GTTTCGGCTC GTAAAACTCT GTTGTTAGAG AAGAACGACC GTGAGAGCAA CTGCTCACGG 480
TGTGACGGTA TCTAACCAGA AAGTCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG 540
TAGGTGGCAA ACGTTGTCGG GATTTATTGG GCGTAAAGCG AGCCGAGCCG GTTTTCTAAG 600
TCTGATCTTG AAACCTCGGC TTAACCGGAG AAGTGCATCG GAAACTGCAT AACTTGAGTC 660
```

よる電気泳動(150V, 1時間)に供した。

【0024】その結果、DA1菌、BG2菌およびSE3菌のみに約900bpのバンドが検出された。

【0025】〔比較例1〕DA1菌、BG2菌およびSE3菌のDNA抽出液について、配列表2の塩基配列を有するプライマーの代わりに、プレビス特異プライマー(配列番号10)、カゼイ特異プライマー(配列番号11)、ファーマンタム特異プライマー(配列番号12)、プラントラム特異プライマー(配列番号13)を用いてPCR法を行ったほかは、例4の手順を繰り返した。ここで、いずれのプライマーもABI社製DNAシンセサイザーで合成した。

【0026】その結果、どのプライマーを用いた場合にも、バンドは確認できなかった。従って、配列番号2の塩基配列を有するプライマーを用いることにより、既知のプライマーを用いても検出や同定ができないある種の乳酸菌を検出および同定することができることが明らかとなった。

【0027】

【発明の効果】本発明により、既知の乳酸菌検出用プライマーで検出や同定ができない乳酸菌を検出および同定できるDNA分子が提供された。また、本発明により、従来の方法では検出できない乳酸菌を迅速に検出または同定することができるようになった。さらに、本発明により、ある種の乳酸菌の16S rRNA遺伝子が提供された。

【0028】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1475

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: 乳酸菌

株名: Lactobacillus sp. DA1

CAGAAAAGGA CAGTGGAACT TCATGTGTAG CGGTGAAATG CGTAGATATA TGAAGGAACA 720  
 CCAGTGGCGA AGGCGGCTGT CTGGTCTGCA TCTGACGCTG AGGCTCGAAA GCATGGGTAG 780  
 CAAACAGGAT TAGATACCCT GGTAGTCCAT GCCGTAAACG ATGAATGCTA GCTGTTGGGA 840  
 GGTITCCGCC TCTCAGTGCC GCAGCTAACG CATTAAAGCAT TCCGCCTGGG GAGTACGACC 900  
 GCAAGGTTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG GACCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGTTTT 960  
 AATTCGATGC TACGCGAAGA ACCTTACCAG GACTTGACAT CTCTGTAA CTAAGAGAT 1020  
 TAGGTGTCCC CTTCGGGGG AGAATGACAG GTGGTGCATG GTTGTCTCA GCTCGTCTCG 1080  
 TGAGATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCTTG TCTTTAGTTG CCAGCATTAA 1140  
 GTTGGGCACT CTAGAGAGAC TGCCGGTGAT AAACCGGAGG AAGGTGGGA TGACGTCAA 1200  
 TCATCATGCC CCTTATGTCC TGGGCTACAC ACGTGCTACA ATGGACGTA CAACGAGTTG 1260  
 CGAAACCGCA AGGTCAAGCT AATCTCTTAA AGCCGTCTC AGTTCGGATT GCAGGCTGCA 1320  
 ACTCGCTGC ATGAAGTTGG AATCGCTAGT AATCGTGGAT CAGCATGCCA CGGTGAATAC 1380  
 GTTCCGGGT CTTGTACACA CCGCCGTC CACCATGAGA GTTTGTAACA CCCAAAGTCG 1440  
 GTTGATAAC CTTTACGAG TCCGCCCT AAGGT 1475

【0029】配列番号：2

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：18

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCTCCTAAC TGATAGCT 18

【0030】配列番号：3

20 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：21

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGAGTTTTGA TCCTGGCTCA G 21

【0031】配列番号：4

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：10

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGTCAATTC CTTTGAGTTT 10

【0032】配列番号：5

30 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：16

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTACCAGCAG AAGAGG 16

【0033】配列番号：6

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：15

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACGGGCGGTG TGTAC 15

【0034】配列番号：7

40 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：16

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCAACGAGCG CAACCC 16

【0035】配列番号：8

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：17

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAGGAGGTGA TCCAGCC 17

【0036】配列番号：9

50 配列の長さ：1503

配列の型：核酸  
鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：Genomic DNA

起源  
生物名：ラクトバチルス プレビス  
株名：L 6 3

## 配列

```
GGCATGCCTA ATACATGCAA GTCGAACGAG CTTCCGTTGA ATGACGTGCT TGGACTGATT 60
TCACCAATGA AGCGAGTGGC GAACTGGTGA GTAACACGTG GGAAATCTGC CCAGAAGCAG 120
GGGATAACAC TTGGAACAG GTGCTAATAC CGTATAACAA CAAAATCCGC ATGGATTTTG 180
TTTGAAAGGT GCCTTCGGCT ATCACTTCTG GATGATCCCG CGCGGTATTA GTTAGTTGGT 240
GAGGTAAAGG CCCACCAAGA CGATGATACG TAGCCGACCT GAGAGGGTAA TCGGCCACAT 300
TGGGACTGAG ACACGGCCCA AACTCCTACG GGAGGCAGCA GTAGGGAATC TTCCACAATG 360
GACGAAAGTC TGATGGAGCA ATGCCGCGTG AGTGAAGAAG GGTTCGCGCT CGTAAAACTC 420
TGTTGTTAAA GAAGAACACC TTGAGAGTA ACTGTTCAAG GGTTGACGGT ATTTAACCAG 480
AAAGCCACGG CTAACACGT GCCAGCAGCC GCGTAATAC GTAGGTGCCA AGCGTTGTCC 540
GGATTTATTG GCGGTAAAGC GAGCGCAGGC GGTTTTTTAA GTCTGATGTG AAAGCCTTCG 600
GCTTAACCGG AGAAGTGCAT CGGAACTGG GAGACTTGAG TGCAGAAGAG GACACTGGAA 660
CTCCATGTGT AGCGGTGGAA TGCCTAGATA TATGAAGAA CACCACTGGC GAAGGCGGCT 720
GTCTAGTCTG TAACTGACGC TGAGGCTCGA AAGCATGGGT AGCGAACAGG ATTAGATACC 780
CTGCTAGTCC ATGCCGTAAA CGATGAGTGC TAAGTGTGG AGGTTTCCG CCCTTCAGTG 840
CTGCAGCTAA CGCATTAAAG ACTCCGCCTG GGGAGTACGA CCGCAAGGTT GAAACTCAAA 900
GGAATTGACG GGGGCCCCGA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA GCTACCGCAA 960
GAACCTTACC AGGTCTTGAC ATCTTCTGCC AATCTTAGAG ATAAGACGTT CCCTTCGGGG 1020
ACAGAATGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTTAAGT 1080
CCCGCAACGA GCGCAACCCT TATTATCAGT TGCCAGCATT CAGTTGGGCA CTCTGGTGAG 1140
ACTGCCGGTG ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA 1200
CCTGGGCTAC ACACGTGCTA CAATGGACGG TACAACGAGT CGCGAAGTCC TGAGGCTAAG 1260
CTAATCTCTT AAAGCCGTTT TCAGTTCGGA TTGTAGGCTG CAACTCGCCT ACATGAAGTT 1320
GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCATGC CGCGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTGATCA 1380
CACCGCCCGT CACACCATGA GAGTTTGTA CACCAAAGC CGGTGAGATA ACCTTCGGGA 1440
GTCAGCCGTC TAAGGTGGGA CAGATGATTA GGTGAAGTC GTAACAAGGT AGCCGTAGGA 1500
GAA 1503
```

【0037】配列番号：10

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

```
AAGTCGAACG AGCTTCC 17
```

【0038】配列番号：11

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

```
GAGAAGAATG GTCCGGC 16
```

【0039】配列番号：12

配列の長さ：11

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

```
CAATCAATTG GGCCAACGCG T 11
```

【0040】配列番号：13

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

TACCCGCATA ACAACTTTGG

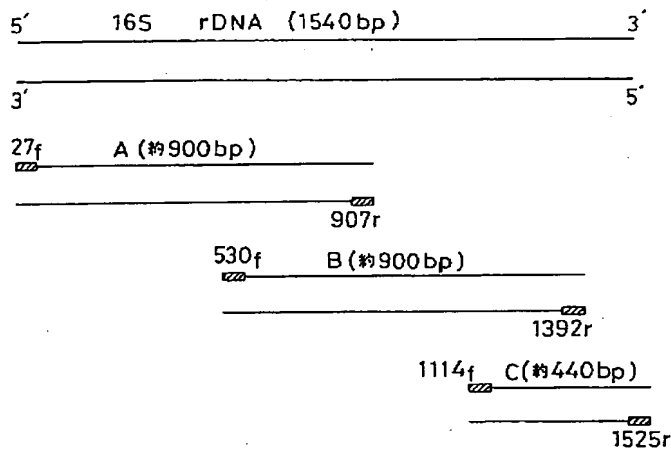
## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、16S rDNA；ユニバーサルプライマー27fおよび907rを用いて増幅される断片A；ユニバーサルプライマー530fおよび1392rを用いて増幅される断片B；およびユニバーサルプライマー1114fおよび1525rを用いて増幅される断片Cの模式図である。

【図2】図2は、乳酸桿菌 *Lactobacillus* sp. DA1および

【図1】

図1 16S rDNA 遺伝子断片の PCR による増幅



19

びラクトバチルス プレビス L63 の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を比較したものである。

【図3】図3は、乳酸桿菌 *Lactobacillus* sp. DA1およびラクトバチルス プレビス L63 の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を比較したもの（図2の続き）である。

【図4】図4は、乳酸桿菌 *Lactobacillus* sp. DA1およびラクトバチルス プレビス L63 の16S rRNA 遺伝子の塩基配列を比較したもの（図3の続き）である。

【図2】

図2 *Lactobacillus* sp. DA1 および *Lactobacillus brevis* L63 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の比較

1	CGTTGGGCGGCTGCTAAATTAACATGCAATCGAAGGCTTC-TAAC	50
-6	.....GGCATGCGCTAA-TA-CATGCAAGTGAACAGGCT-TCCGT----	43
51	TGATA-G-CTGGTCTTGCATCAGCTTG-ACGATA-GATCTGACCGAGTG	100
44	TGA-ATGAC-G-TGCTTGCA-CYCATTTACCA-ATGAA-G-C-GAGTG	93
101	CGGAACCTGGTGAATACAGTGGTAACTGGCCAGAGAAAGGGATAC	150
94	CGGAACCTGGTGAATACAGTGGTAACTGGCCAGAGAAAGGGATAC	143
151	ACCTGGAAACAGATGCTAATACCTATACACAGAA-CCACATGG-TT	200
144	ACTTGGAAACAGATGCTAATACCTATACACAGAA-CCACATGGATTT	193
201	CTCGTTGAAGATGGCTTTTAAGCTATCGCTTCTGGATGGA-CCCGCGG	250
194	TT-GTTTGAAGGTGGCTTGG-GCTATCACTTCTGGATG-ATCCCGCGG	243
251	CGTATTAGCTAGTTGGTGAGATATAG-CTACCAAGGCAATGAACGTA	300
244	CGTATTAGCTAGTTGGTGAGATATAG-AGGCCACCAAGAGATGATAGTA	293
301	CGAGACCTGAGAGGGTAATCTGCCAATGGGACTGACACAGGCCCATTA	350
294	CGGACCTGAGAGGGTAATCTGCCAATGGGACTGACACAGGCCCATTA	343
351	CTCTTACGGGAGGAGCAAGTACGGAATCTTCCACAAATGACGAAGTCTG	400
344	CTCTTACGGGAGGAGCAAGTACGGAATCTTCCACAAATGACGAAGTCTG	393
401	ATGGAGCAACGCGCGCTGACTGAAGAAGGTTTGGGCTCTGAAACTCTG	450
394	ATGGAGCAATGCGCGCTGACTGAAGAAGGTTTGGGCTCTGAAACTCTG	443
451	TTGTTAGAGAAAGACGACCT-AGAGCAACTCTACGGTGT-GACGCT	500
444	TTGTTAGAGAAAGAC-ACCTTTCAGAGTAATCTTCAAGG-GTTGACGCT	493



【図3】

図3 *Lactobacillus* sp. DA1 および *Lactobacillus*  
*brevis* L63 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の比較  
 (図2の続き)

```

501 ATCTAACGAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCGACGAGCGGGTANTAC
543
551 GTAGGTGCGAAGCGTTTCTCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGAGGC
593
544 GTAGGTGCGAAGCGTTTCTCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGAGGC
600
601 GCTTTCTAAGTCTGATGTGAAA-C-PTCCGCTTAACCGGAGAACTGCA
643
594 GCTTTTAAATCTGATGT-GAAGCGCTTCGGCTTAACCGGAGAACTGCA
700
651 TCGGAAGTGG-ATAACTGAGTGCAGAAAAGGACAGTGGAACTTCATGT
693
644 TCGGAAGTGGGAGA-CTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTTCATGT
750
701 GTAGCGGTGAATCGGTGATATATG-AAGGAAACAGTGGCGAAGCGG
743
594 GTAGCGGTGAATCGGTGATATATGAAAG-AACACTAGTGGCGAAGCGG
800
751 GCTGTCTGCTTGCATCTGAGCGTGAAGCGTGGTGAAGCAATCGTGAAGC
793
744 GCTGTCTAGTCTGTAACTGACCTGAGCGTGAAGCAATCGTGAAGC
850
801 AGGATAGATACCTCTGATGATGATGCGTGAAGCAATCGTGAAGC
843
794 AGGATAGATACCTCTGATGATGATGCGTGAAGCAATCGTGAAGC
900
851 TGGGAGG-TTCCGCTCT-CAGTGGCGAGCTTAAGCAATCGTGAAGC
893
844 TGG-AGGCTTTCGCGC-CTTCAGTGGCGAGCTTAAGCAATCGTGAAGC
950
901 GCTTGGGAGTACGAGCGGAGTGGTGAAGCAATCGTGAAGC
943
894 GCTTGGGAGTACGAGCGGAGTGGTGAAGCAATCGTGAAGC
1000
951 CCGCACAAGCGGTGAGCATGTGTTTAAATCGATGCTACGCGAAGAAC
993
944 CCGCACAAGCGGTGAGCATGTGTTTAAATCGAAGCTACGCGAAGAAC
1050
1001 TTACCAAGACTTGACATCTCTCTGTAACTTAAGAGATTAG--GTGTCGCC
1043
994 TTACCAAGCTCTGACATCTCTTCCCAATCTTAGAGATTAGAGCT-TCGC-

```

【図4】

図4 *Lactobacillus* sp. DA1 および *Lactobacillus*  
*brevis* L63 の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の比較  
 (図3の続き)

```

1051 TTCCGGGCGGAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCGACGAGCGGGTANTAC
1100
1044 TTCCGGGCGGAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCGACGAGCGGGTANTAC
1053
1101 GAGATGTTGGGTAACTCCCGCAACGAGCGCAACCGCTTGTCTTT-AGTTG
1150
1094 GAGATGTTGGGTAACTCCCGCAACGAGCGCAACCGCTTGTCTTT-AGTTG
1143
1151 CCAGCATTAAGTGGGCACTTAGAGAGACTGCGGTGATAAAGCGGAGG
1200
1144 CCAGCATTAAGTGGGCACTTAGAGAGACTGCGGTGATAAAGCGGAGG
1193
1201 AAGGTGGGATGACCTCAAAATCATATGCGGCTTATGCTGCGGTGACAC
1250
1194 AAGGTGGGATGACCTCAAAATCATATGCGGCTTATGCTGCGGTGACAC
1243
1251 AAGGTGGGATGACCTCAAAATCATATGCGGCTTATGCTGCGGTGACAC
1300
1244 AAGGTGGGATGACCTCAAAATCATATGCGGCTTATGCTGCGGTGACAC
1293
1301 TAATCTCTTAAAGCGCTTCTCAATTCGGATTCAGGCGTCAACTCGCTG
1350
1294 TAATCTCTTAAAGCGCTTCTCAATTCGGATTCAGGCGTCAACTCGCTG
1343
1351 CATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCGCGGTGAATA
1400
1344 CATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCGCGGTGAATA
1393
1401 CGTTCGCGGCTCTTGTACACACCGCGCTCAACCATGAGAGTTTGTAAAC
1450
1394 CGTTCGCGGCTCTTGTACACACCGCGCTCAACCATGAGAGTTTGTAAAC
1443
1451 ACCCAAGTCCGTTG-GATAACCTTTACGG-AGTCCGCGC-C-----
1500
1444 ACCCAAGTCCGTTG-GATAACCTTTACGG-AGTCCGCGC-C-----
1493
1501 --C---T-A--AGC-T-----
1550
1454 GACAGATGATTAGGGTGAAGTCTGAACAGGTAGCGGTAGGAGAA....
1543

```

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 R 1:225)  
 (C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 R 1:24)  
 (C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 R 1:245)  
 (C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 R 1:25)

Z N A

Z N A

Z N A

Z N A

C 1 2 R 1:225)

(C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 R 1:24)

(C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 R 1:245)

(C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 R 1:25)